

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-149095

(43)Date of publication of application : 05.06.2001

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
G01N 33/50
G01N 33/566
// C12N 15/09

(21)Application number : 11-333334

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP
HIROSHIMA INDUSTRIAL
TECHNOLOGY ORGANIZATION

(22)Date of filing : 24.11.1999

(72)Inventor : YOSHIZATO KATSUTOSHI
OBARA MASANOBU(54) RECOGNITION OF ACTIVATED STATE OF STELLATE CELL OF LIVER AND DIAGNOSIS
OF HEPATIC DISORDER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for accurately recognizing the activated state of stellate cell of liver and provide a diagnostic method for surely finding hepatic disorder and accurately making the diagnosis at a low cost.

SOLUTION: The activated state of stellate cell of liver is recognized by using the expression quantity of CAR of a specimen containing stellate cell of liver as an index. The hepatic disorder is diagnosed by determining the expression quantity of CAR of a specimen containing stellate cell of liver and judging the liver as the disordered state when the expression quantity of CAR of the specimen is increased compared with the expression quantity of a specimen originated from normal liver.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of
rejection][Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection][Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-149095

(P2001-149095A)

(43) 公開日 平成13年6月5日 (2001.6.5)

(51) IntCl. ⁷	識別記号	F I	キーワード (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	T 4 B 0 2 4
33/566		33/566	4 B 0 6 3
// C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平11-333334

(22) 出願日 平成11年11月24日 (1999. 11. 24)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71) 出願人 596063056

財団法人広島県産業技術振興機構

広島県広島市中区千田町3丁目7-47

(72) 発明者 吉里 勝利

広島県東広島市八本松南7丁目22-13

(72) 発明者 小原 政信

広島県東広島市西条中央3丁目31-15

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝星細胞の活性化状態認識方法及び肝障害の診断方法

(57) 【要約】

【課題】 肝星細胞の活性化状態を正確に認識する方法と、肝障害を確実に発見し、より適格な診断を下すことができる経済的にも優れた診断方法を提供する。

【解決手段】 肝星細胞を含む検体のCARの発現量を指標として肝星細胞の活性化状態を認識する方法と、肝星細胞を含む検体のCARの発現量を測定し、正常肝臓由来の検体に比較してCARの発現量が增大している検体が属していた肝臓が障害状態にあると判定する肝障害の診断方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝星細胞を含む検体のCAR (Coxsackie-adenovirus receptor) の発現量を指標として肝星細胞の活性化状態を認識することを特徴とする肝星細胞の活性化状態認識方法。

【請求項2】 肝星細胞を含む検体のCAR (Coxsackie-adenovirus receptor) の発現量を測定し、正常肝臓由来の検体に比較してCARの発現量が増大している検体が属していた肝臓が障害状態にあると判定することを特徴とする肝障害の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、医学・生物学研究等に有用な肝星細胞の活性化状態認識方法と、医療技術として有用な肝障害の診断方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】肝臓は、蛋白質合成、尿素代謝および糖代謝等といった生体内における多種多様の代謝を担う中心的な臓器である。肝臓は生体内における重要な臓器であるため、ウイルスや薬物等により障害を受けた場合であっても、旺盛な再生能力等によりその機能を維持しようとする。したがって、肝臓の障害は、重篤な機能不全に陥るまで認知することは困難であり、また、障害を認知したときには生命への危険が生じることから、これを早期に発見することが求められてきた。

【0003】ところで、急激な肝細胞の破壊を生じる急性肝炎、肝細胞の破壊と再生とが繰り返される慢性肝炎、および肝臓組織内での細胞外マトリックスの産生亢進と異常蓄積とを伴う肝線維症（肝硬変）は、病理学的に定義づけられた疾患概念であることから、正確には腹腔鏡や肝生検を実施して病理学的に診断を行う必要があった。

【0004】しかしながら、腹腔鏡や肝生検を反復して行って病理学的に診断を確定するのは容易ではない。そこで、血液学的検査や血液生化学的検査による診断方法やUS、CT等の画像検査による診断方法あるいは星細胞の活性化を認識する方法等が開発されてきた。

【0005】例えば、肝線維症の診断に際しては、血液中に存在する血小板数の減少や、肝細胞の機能障害を反映して生じるアルブミン、コリンエステラーゼおよびコレステロール等の減少、血漿遊離アミノ酸異常およびγ-グロブリン、IV型コラーゲンやヒアルロン酸等の上昇等が診断の指標として用いられてきた。また、肝線維症におけるコラーゲン等の細胞外マトリックス成分は、その殆どが活性化された星細胞によって産生されることが知られていることから、例えば、I型コラーゲンやIII型コラーゲンの発現を指標として星細胞の活性化を認識し、診断に用いることも試みられている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、元来、肝臓は予備能力や再生能力の大きい臓器であるために、軽度の肝障害が存在している場合でも、血液的検査や多くの血液生化学的検査に異常が認められないことがしばしば生じることから、これらを指標とした早期診断が必ずしも現実を反映しておらず、確定的な診断を下せないという問題があった。また、US、CT等の画像検査を実施するためには、画像診断装置とオペレータを備えた施設が必要であるが、画像診断装置は高価だけでなく、維持や管理にも多くの費用を要するため、経済的な負担も大きいという問題があった。さらに、I型コラーゲンやIII型コラーゲンの発現を指標として星細胞の活性化を認識する場合にも、I型コラーゲンやIII型コラーゲンの発現に顕著な変化が認められないことがしばしば生じ、必ずしも検体を十分に評価することができないという問題があった。

【0007】この出願の発明は、以上のとおりの従来の現状を鑑みてなされたもので、肝星細胞の活性化状態を確実に認識することのできる方法を提供することを課題としている。

【0008】また、この出願の発明は、肝障害を確実に発見し、よりの確な診断を下すことができるだけでなく、経済性にも優れた診断方法を提供することを課題としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】この出願の発明者らは、ラット肝不全モデルを用いた研究において、星（伊東）細胞上のアデノウイルス受容体（CAR: Coxsackie-adenovirus receptor）タンパク質が、肝不全、ひいては肝硬変の進行に伴って高度に誘導されることを見出した。この出願は、以上のとおりの知見に基づき、以下の(1)および(2)の発明を提供する。

(1) 肝星細胞を含む検体のCAR (Coxsackie-adenovirus receptor) の発現量を指標として肝星細胞の活性化状態を認識することを特徴とする肝星細胞の活性化状態認識方法。

(2) 肝星細胞を含む検体のCAR (Coxsackie-adenovirus receptor) の発現量を測定し、正常肝臓由来の検体に比較してCARの発現量が増大している検体が属していた肝臓が障害状態にあると判定することを特徴とする肝障害の診断方法。

【0010】前記発明(1)の方法によれば、肝星細胞の活性化状態を確実に認識することが可能となる。この方法により特定された活性化肝星細胞は、例えば、肝障害の原因、進行等の原因解明や、肝障害の予防ないしは治療法を開発するための研究材料として有効に利用される。

【0011】前記発明(2)の方法によれば、肝障害の有無および進行状態をほぼ確実に把握することができるので、肝障害に対する的確な診断を下すことが可能とな

る。また、画像診断装置等の高度な医療設備を必要としないため、経済的に診断を実施することができる。

【0012】さらに、血液中に含まれる可溶性CARは、免疫法、クロマトグラフィー法、電気泳動法などにより容易に検出できる。以下、発明の実施形態についてさらに詳しく説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】一般に、何らかの要因により肝細胞が質的に変化、あるいは数が減少して肝障害に陥ると肝機能が低下した場合によっては肝不全に至る。肝不全は、急性肝不全と慢性肝不全とに大別されるが、これら肝不全の場合はもちろん、肝不全にまでは至らない肝障害のいずれにおいても、肝細胞の破壊と再生とが惹起される結果、クッパー細胞や内皮細胞等による星細胞の活性化が生じることになる。星細胞は、類洞の内皮細胞を取り囲み収縮機能を備えることから、その機能の一つとして類洞の血流調節を担うと考えられている。しかしながら、星細胞は、肝障害等が引き金となり活性化されると、コラーゲン等の細胞外マトリックス成分を産生し、これに続く肝組織内での細胞外マトリックスの産生亢進と異常蓄積とにより、類洞の毛細血管化や偽小葉の形成が生じる。その結果、肝臓における線維化が進行して肝線維症に至ることになる。このとき、肝障害に応じて、星（伊東）細胞上のCARタンパク質が誘導されることから、CAR発現量を指標として活性化星細胞を特定することができる。また、星細胞を含む検体におけるCARの発現を評価すれば、肝障害の有無および進行状態をほぼ確実に把握でき、肝障害に対する的確な診断を下すことができる。

【0014】前記発明(1)および(2)の方法において、星細胞を含む肝臓由来の検体としては、例えば、Nycodenz（ニコデンズ）密度勾配遠心法等により生体より採取された肝臓由来の器官や組織、あるいは生体外にて培養した器官、組織および培養細胞等である。生体より採取された肝臓を検体とした場合には、肝障害の有無および進行状態をほぼ確実に把握できることから、肝障害に対する的確な診断を下すことができる。さらに、生体外にて培養した器官、組織および培養細胞を検体とした場合には、例えば、培養細胞内に含まれた星細胞の活性化を認識することができるので、肝障害のモデル実験等においても有効な指標として機能する。

【0015】また、検体におけるCARの発現を確認する方法としては、例えば、CARに特異的なプライマーを用いたRT-PCR、特異的プローブを用いたノーザン解析、RNaseプロテクションアッセイおよびin situ ハイブリダイゼーション等の核酸レベルの検出手段や、CARと特異的に結合する抗体による蛋白質レベルでの検出手段等を用いることができる。さらに、CARと特異的に結合する抗体等を、例えば、放射性物質や蛍光タンパク質（例えばGFP）等により標識しておき、放射

能や蛍光等の信号を検出できるようにすることで、検体を損傷することなくCARの発現を測定することができる。このとき、検体から生じる信号を連続的に検出して、その強度を記録すれば、リアルタイムでCARの発現を測定することができる。なお、上記プライマー、プローブおよび抗体等は、CARを特異的に検出できるのである、なんら限定されるものではない。なお、検体は、CARの発現を確認することが可能であるならば、組織切片の作製のみならずホモジネートする等、任意に加工してもよい。

【0016】さらに、CARの発現に基づいて検体を評価する方法としては、例えば、検体より検出されたCAR mRNAあるいはCAR蛋白質の発現量や発現領域等を確認し、これらの情報から活性化星細胞の数や星細胞の活性化の頻度を見積もることにより、検体を評価することができる。一般に、検体より確認できる情報（CARの発現）は、活性化星細胞の数や星細胞の活性化の頻度により微妙に異なっている。したがって、活性化星細胞の数や星細胞の活性化の頻度に対し、CARの発現量や発現部位等に関する情報を予め収集しておき、実際に獲得された情報と予め収集した情報とを照合すれば、容易に検体の評価を行うことができる。

【0017】また、CARの発現とともに、上述したI型コラーゲンやIII型コラーゲンの発現の変化を併せて測定しておき、これらの情報を合成する等により情報を加工し、加工された情報に基づいて検体を評価するようにしてもよい。この場合には、検体に対し、より詳細な評価を与えることが可能となる。

【0018】この出願の発明によれば、CARの発現を指標とすることにより星細胞の活性化状態を容易に認識することができるが、CARは細胞へのアデノウイルスの感染に必須な分子でもある。したがって、CARを用いて星細胞の活性化状態を認識し、あるいは検体を診断した後、アデノウイルスベクターを用いて、肝線維症の肝臓等における星細胞に対し選択的に遺伝子を導入することができ、必要に応じて、診断と遺伝子導入とをほぼ同時に実施することが可能となる。例えば、検体を診断した後、細胞外マトリックスの産生に関わる遺伝子をアデノウイルスベクターにより星細胞に対し選択的に導入すれば、細胞外マトリックスの産生や蓄積を抑制する効果が期待できる。

【0019】なお、この出願の発明に係る認識方法および診断方法は、各種の基礎研究や臨床的な診断にはもちろんのこと、医薬品の治験等の臨床検査や化学物質等の安全評価等の各種用途に対して適用できるのはいうまでもない。

【0020】

【実施例】以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例1

ラットCARのcDNAクローニングを行った。CARは、ヒトおよびマウスよりcDNAがクローニングされており、両者間において非常に高い相同性が報告されている。そこで、二種の特異的プライマーを作製し、これを用いてRT-PCR法によりcDNAクローニングを行った。なお、RT-PCRのプライマーとしては、プライマー1（配列番号2）およびプライマー2（配列番号3）を用いた。次に、ラット正常肝臓より全RNAをAGPC法にて抽出し、その1.0 μ gを用いてMLV Reverse Transcriptaseにより50°Cで30分にわたり逆転写を行った。逆転写の後、上記プライマーを用い、逆転写産物（鋳型DNA量）の1/10を用いて、DNA増幅装置（STRATA-GENE社：Robocycler Gradient 96）により、95°Cにて45秒、55°Cにて45秒および72°Cにて1分の連続的な温度変化を35回繰り返してPCR反応を行った。そして、得られたPCR反応物をpCR-II（INVITROGEN）にサブクローニングした後、塩基配列を決定した。決定された塩基配列とこれに基づいて推定されたアミノ酸配列を配列番号1に示す。ここで、得られた塩基配列およびアミノ酸配列をヒトおよびマウスCARと比較したところ、ヒトCARと91%、マウスCARと97%の相同性が認められたことから、PCR反応物はラットCARのcDNAであることが確認された。

実施例2

次に、ラットに対し四塩化炭素を投与することにより肝線維症を誘発させた。すなわち、10週令（体重200-250g）の雄F344Crjラットの大腿部に、7週間にわたり週2回、オリーブ油に溶解した四塩化炭素を体重100gあたり0.25mgの割合で筋注した。図1aおよび図1bに示したように、正常なラットの肝臓組織に由来する銀染色像（図1a）と、四塩化炭素により処理されたラットの肝臓組織に由来する銀染色像（図1b）とを比較すると、四塩化炭素により処理されたラットの肝臓は、正常なラットの肝臓と比べて明らかにコラーゲンを主成分とする膠原線維（201）および細網線維（202）を形成していた。したがって、上記ラットの肝臓は、病理学的に肝線維症を発症していることが確認された。肝臓組織の銀染色は、4°Cにおいて、取りだした肝臓を4%ホルムアルデヒドで一晩固定した後、パラフィン包埋し、7 μ mの間隔で切断した切片を染色する（Ann. Histochem., 16:29-40, 1971）ことで行われた。

【0021】次いで、上記肝線維症を発症したラットの肝臓から、two-step collagenase perfusion法（Am. J. Pathol., 149:383-392, 1996; Exp. Cell. Res. 139:468-471, 1982）により1-3 $\times 10^6$ の星細胞を分離し、10% FBS (fetal bovine serum: Hyclone Laboratories, Logan, UT) を含むDMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) により、37°C、5%炭酸ガス存在下で3時間にわたり培養を行った。なお、培養した細胞集団においては、その

95%以上が α 平滑筋アクチンを発現していることから、この細胞集団はほぼ活性化した星細胞からなることを確認している。

【0022】次に、上記星細胞および正常なラットの肝臓を用いた以外は全く同様に調製された星細胞に対して、各遺伝子の遺伝子発現を半定量的RT-PCR法により分析した。すなわち、遺伝子発現は、I型およびIII型コラーゲンの $\alpha 1$ サブユニット遺伝子（COL $\alpha 1$ (I)およびCOL $\alpha 1$ (III)）、インテグリン $\alpha V\beta 3$ を構成するインテグリンサブユニット αV および $\beta 3$ 遺伝子（ αV および $\beta 3$ ）、およびCAR遺伝子（CAR）について分析した。また、RT-PCR法に用いた各遺伝子に対する特異的なプライマーの配列は、コラーゲン $\alpha 1$ (I)は配列番号4（プライマー1）および配列番号5（プライマー2）、コラーゲン $\alpha 1$ (III)は配列番号6（プライマー1）および配列番号7（プライマー2）、インテグリン αV は配列番号8（プライマー1）および配列番号9（プライマー2）、インテグリン $\beta 3$ は配列番号10（プライマー1）および配列番号11（プライマー2）である。なお、インテグリン $\alpha V\beta 5$ については、ラットインテグリンサブユニット $\beta 5$ がクローニングされていないので、遺伝子発現について検討しなかった。しかしながら、インテグリンは $\alpha\beta$ サブユニットからなるヘテロダイマーとして機能を発揮することから、 αV インテグリンサブユニットに関する知見のみでも遺伝子発現の解析結果を考察するには有効な情報を提供する。また、CARに関しては、上記プライマー（配列番号2および3）を用いてPCRを行った。

【0023】はじめに、培養した星細胞（1-3 $\times 10^6$ ）を培養皿から剥離し、全RNAをAGPC法にて抽出した。次いで、全RNAの1.0 μ gを用いてMLV Reverse Transcriptaseにより50°Cで30分にわたり逆転写を行った。逆転写の後、各遺伝子について上記プライマーを用いPCR反応を行った。PCR反応は、COL $\alpha 1$ (I)、COL $\alpha 1$ (III)、 αV 、 $\beta 3$ およびCARについて、それぞれ逆転写産物（鋳型DNA量）の1/10、1/30、1/160、および1/1を鋳型として用い、DNA増幅装置（STRATA-GENE社：Robocycler Gradient 96）により、95°Cにて45秒、55°Cにて45秒および72°Cにて45秒の連続的な温度変化を35回繰り返すことにより行った。次に、PCR反応により得られたPCR産物を、それぞれアガロースゲル電気泳動法にて分離した後エチジウムブロミドにより染色した。なお、PCR反応に定量性を持たせるために、PCR反応に用いる鋳型DNA量は各遺伝子ごとに1-4倍の希釈系列を作製して実施した。

【0024】図2（Lane1-4は正常なラットの肝臓に由来した星細胞、Lane5-8は肝線維症を発症したラットに由来した星細胞のPCR産物に対応し、かつ1、2、4および8倍希釈に対応している）から明かなように、肝線維症の指標となりうるI型およびIII型コラーゲンの α

1サブユニット遺伝子は、正常な肝臓に由来した星細胞と比べ肝線維症を発症した肝臓に由来した星細胞について著しい亢進が認められた。したがって、図1bに示した肝臓は、形態的にももちろん、分子的にも肝線維症を発症していることが確認された。

【0025】ここで、CARの発現については、I型およびIII型コラーゲンの $\alpha 1$ サブユニット遺伝子と同じように、正常な肝臓に由来した星細胞より肝線維症を発症した肝臓に由来した星細胞について著しい亢進が認められた。なお、インテグリンサブユニット αV および $\beta 3$ 遺伝子に関しては、正常な肝臓に由来した星細胞と肝線維症を発症した肝臓に由来した星細胞との間で顕著な差を認めることができず、また、各遺伝子の増幅産物についても倍数希釈に応答して染色がなされていることから、このRT-PCRは十分な信頼性を保ってなされてお

り、肝線維症により星細胞におけるCARの発現が上昇することが結論された。したがって、星細胞の活性化状態はCARの発現を指標として認識できるとともに、星細胞のCAR発現量を指標として肝線維症の診断が可能であることが確認された。

【0026】

【発明の効果】以上詳しく説明したように、この出願の発明によって、肝星細胞の活性化状態を確実に認識することが可能となる。また、肝障害の有無および進行状態をほぼ確実に把握することができるので、肝障害に対する確な診断を下すことが可能となる。しかも、画像診断装置等の高度な医療設備を必要としないため、経済的に診断を実施することができる。

【0027】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<:110>: Japan Science and Technology Corporation

<:120>: 肝星細胞の活性化状態認識方法と肝障害の診断方法

<:130>:

<:140>:

<:141>:

<:160>: 11

<:170>: PatentIn Ver. 2.0

<:210>: 1

<:211>: 578

<:212>: DNA

<:213>: Rattus

<:220>:

<:221>: CDS

<:222>: (1)... (576)

<:400>: 1

```

cgg gta cat ttt acg agt aac gac gtc aag tct ggc gac gca tgc ata 48
Arg Val His Phe Thr Ser Asn Asp Val Lys Ser Gly Asp Ala Ser Ile
  1          5          10          15
aat gtg acc aat ctg cag ttg tcc gat att ggc act tac cag tgc aaa 96
Asn Val Thr Asn Leu Gln Leu Ser Asp Ile Gly Thr Tyr Gln Cys Lys
          20          25          30
gtg aag aaa gct cct ggg gtt gca aat aga aaa ttt ctg ctg aca gtt 144
Val Lys Lys Ala Pro Gly Val Ala Asn Arg Lys Phe Leu Leu Thr Val
          35          40          45
ctt gtt aag cct tca ggt aca agg tgc ttc gtg gat ggc tgc gga gag 192
Leu Val Lys Pro Ser Gly Thr Arg Cys Phe Val Asp Gly Ser Gly Glu
          50          55          60
att gga aat gac ttc agg cta aag tgt gaa ccc aaa gaa ggt tcc ctc 240
Ile Gly Asn Asp Phe Arg Leu Lys Cys Glu Pro Lys Glu Gly Ser Leu
          65          70          75          80
cca ctg cag tat gaa tgg cag aaa ttg tca gat tcc cag aaa atg cct 288
Pro Leu Gln Tyr Glu Trp Gln Lys Leu Ser Asp Ser Gln Lys Met Pro
          85          90          95
act cca tgg cta gca gaa atg act tca ccg gtt ata tct gtg aaa aat 336

```

Thr Pro Trp Leu Ala Glu Met Thr Ser Pro Val Ile Ser Val Lys Asn
 100 105 110
 gcc agt tct gag tat tct ggg acc tac agt tgc aca atc caa aac aga 384
 Ala Ser Ser Glu Tyr Ser Gly Thr Tyr Ser Cys Thr Ile Gln Asn Arg
 115 120 125
 gtg ggc tct gat cag tgt atg cta cga cta gat gct gtc cct ccc tcc 432
 Val Gly Ser Asp Gln Cys Met Leu Arg Leu Asp Ala Val Pro Pro Ser
 130 135 140
 aac aga gct gga acg atc gcg gga gct gtc ata ggg acg ctg ctt gcc 480
 Asn Arg Ala Gly Thr Ile Ala Gly Ala Val Ile Gly Thr Leu Leu Ala
 145 150 155 160
 ctt gtg etc atc ggg gcc atc etc ttc tgc tgt cat aaa aaa cgc aga 528
 Leu Val Leu Ile Gly Ala Ile Leu Phe Cys Cys His Lys Lys Arg Arg
 165 170 175
 gaa gag aag tac gag aag gaa gtg cat cac gat atc agg gaa gat gtg 576
 Glu Glu Lys Tyr Glu Lys Glu Val His His Asp Ile Arg Glu Asp Val
 180 185 190
 cc 578
 <:210>; 2
 <:211>; 20
 <:212>; DNA
 <:213>; Artificial sequence
 <:220>;
 <:223>; Synthesized oligonucleotide
 <:400>; 2
 cgggtacatt ttacgagtaa 20
 <:210>; 3
 <:211>; 20
 <:212>; DNA
 <:213>; Artificial sequence
 <:220>;
 <:223>; Synthesized oligonucleotide
 <:400>; 3
 ggcacatctt ccctgatatc 20
 <:210>; 4
 <:211>; 23
 <:212>; DNA
 <:213>; Artificial sequence
 <:220>;
 <:223>; Synthesized oligonucleotide
 <:400>; 4
 gaagacctat gtgggtataa gtc 23
 <:210>; 5
 <:211>; 20
 <:212>; DNA
 <:213>; Artificial sequence
 <:220>;
 <:223>; Synthesized oligonucleotide
 <:400>; 5
 ccctgcttta tgccagcaat ca 22

<:210>: 6
 <:211>: 23
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial sequence
 <:220>:
 <:223>: Synthesized oligonucleotide
 <:400>: 6
 tgctgccatt gctggagttg gag
 <:210>: 7
 <:211>: 22
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial sequence
 <:220>:
 <:223>: Synthesized oligonucleotide
 <:400>: 7
 gttggcactt tcaactggtg ac
 <:210>: 8
 <:211>: 25
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial sequence
 <:220>:
 <:223>: Synthesized oligonucleotide
 <:400>: 8
 aagctggaag tttctgtata tagtg
 <:210>: 9
 <:211>: 25
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial sequence
 <:220>:
 <:223>: Synthesized oligonucleotide
 <:400>: 9
 ttggtgatga gatgattcct tcctc
 <:210>: 10
 <:211>: 25
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial sequence
 <:220>:
 <:223>: Synthesized oligonucleotide
 <:400>: 10
 gctacagtct gtgatgaaa aattg
 <:210>: 11
 <:211>: 25
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial sequence
 <:220>:
 <:223>: Synthesized oligonucleotide
 <:400>: 11
 ctcgttggtg aggcaggtgg cattg

23

22

25

25

25

25

【図面の簡単な説明】

【図1】正常なラットの肝臓組織に由来する銀染色像

と、四塩化炭素により処理されたラットの肝臓組織に由来する銀染色像とを示した図である。

!(8) 001-149095 (P2001-14JL8

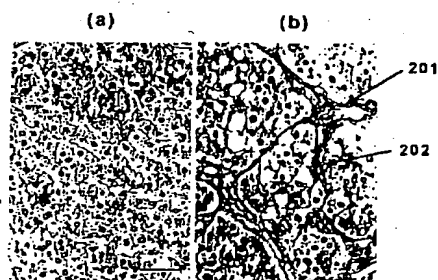
【図2】遺伝子発現の解析結果を示した図である。

【符号の説明】

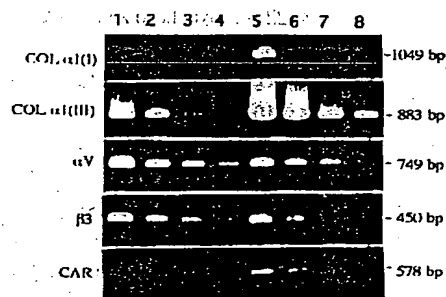
201……膠原線維

202……細網線維

【図1】



【図2】



フロントページの続き

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB26 DA36 DA77 GC30
4B024 AA11 BA63 CA04 CA09 EA04
HA14
4B063 QA01 QA07 QA19 QQ08 QQ42
QQ79 QR32 QR36 QR38 QR48
QR51 QR55 QR62 QS13 QS25
QS34 QS36 QX02 QX07